

IVONE RODRIGUES MACENA

ESTUDOS SOBRE O METABOLISMO DE **Bacillus cereus**  
ISOLADOS DE ALIMENTOS ADQUIRIDOS NO MERCADO  
VAREJISTA DA CIDADE DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL

Trabalho de monografia para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas - Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aginaldo José do  
Nascimento - Departamento de Bioquímica.

Co - orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilma Hiroko Higuti  
- Departamento de Patologia Básica

CURITIBA  
1997

Monografia orientada pelos  
Professores Doutores Aguinaldo José  
do Nascimento e Ilma Hiroko Higuti

*Creio invencivelmente que a ciência e a paz  
trunfarão da ignorância e da guerra, que os  
povos chegarão a um acordo não para destruir,  
mas para construir, e que o futuro pertencerá  
aos que mais tiverem trabalho para aliviar o  
sofrimento humano.*

**Pasteur**

## AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Hiroko Higuti pela capacidade de ensinar, orientar, pelo trabalho produtivo, entusiasmo e consequentemente, pela capacidade de liderança.

Ao Prof. Dr. Mário Branco Filho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marita M. M. Blaskowski, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma F. Z. Baggio e Prof<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel pelo apoio amizade e sugestões recebidas ao longo do trabalho.

À servidora Marisa S. Borges e demais servidores do Setor de Ciências Biológicas, pelo companheirismo, disponibilidade de ajuda e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito desta monografia.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas .....	i
Lista de figuras .....	ii
Resumo .....	iii
	Página
Introdução .....	1
Características principais do <b><i>B. cereus</i></b> .....	3
Sensibilidade aos antibióticos .....	6
Objetivos .....	9
Materiais e Métodos .....	11
Microrganismo .....	11
Conservação das cepas .....	11
Meio de cultivo .....	12
Teste de fermentação de carboidratos .....	12
Atividades das enzimas .....	13
Hemolisina .....	13
Fosfolipase C .....	13
Produção de toxina letal para camundongos e cálculo da DL50 .....	14
Teste de sensibilidade à antibióticos .....	15
Curva de crescimento .....	17
Cinética da enzima invertase do <b><i>B. cereus</i></b> .....	18
Resultados e Discussão .....	19
Caracterização morfológica e bioquímica das cepas de <b><i>B. cereus</i></b> .....	19
Teste de fermentação da sacarose .....	22
Síntese da hemolisina .....	22
Síntese de fosfolipase C .....	22
Produção de toxina letal para camundongos e determinação da DL50 .....	22
Teste de sensibilidade a antibióticos .....	27
Curva de crescimento de <b><i>B. cereus</i></b> .....	27
Atividade da enzima invertase de <b><i>B. cereus</i></b> .....	31
Conclusões .....	38
Referências Bibliográficas .....	39

## LISTA DE TABELAS

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

	Página
I. Caracterização morfológica e bioquímica de <i>B. cereus</i> isolados de fubá e farinha de mandioca.....	20
II. Teste de sensibilidade a antibióticos.....	29
III. Fermentação da sacarose e atividade da invertase em cepas de <i>B. cereus</i> .....	36

## LISTA DE FIGURAS

	Página
01. Ilustração do teste de fermentação versus utilização aeróbica de carboidratos.....	23
02. Atividade da hemolisina .....	24
03. Atividade da fosfolipase C.....	24
04. Tempo de morte dos camundongos.....	25
05. Peso dos camundongos.....	26
06. Curva para a determinação da DL50 .....	28
07. Curva de crescimento de <i>B. cereus</i> usando sacarose como fonte de carbono.....	30
08. Fotografia obtida em microscópio ótico de <i>B. cereus</i> isolados de alimentos em Curitiba .....	32
09. Curva de temperatura da invertase de <i>B. cereus</i> .....	33
10. Curva de pH da invertase de <i>B. cereus</i> .....	34
11. Curva de concentração protéica para a invertase de <i>B. cereus</i>	

## RESUMO

Trinta e uma cepas de *Bacillus cereus* foram isoladas e caracterizadas de fubá e farinha de mandioca, obtidas no mercado varejista de Curitiba, PR. Essas cepas apresentaram colônias características em ágar MYP. Foram positivas para as provas de produção de acetoina, motilidade, redução de nitrato, hidrólise de gelatina e negativas para produção de cristais de endotoxinas, indol, H<sub>2</sub>S e urease. Foram incapazes de fermentar a lactose e manitol e algumas (8) dessas cepas não apresentaram capacidade de fermentar a sacarose em condições anaeróbicas. Entretanto, foram capazes de crescer em caldo nutriente contendo sacarose como fonte de carbono, em condições aeróbicas com agitação constante (Rotatory Shaker, 120 rpm). Procurou-se então verificar, nessas cepas, os níveis de atividade da enzima invertase. O ensaio da atividade da invertase foi realizado em extrato livre de células, utilizando 3,5-dinitrosalicilato como reagente para determinação de açúcares redutores. Os resultados obtidos indicaram que a enzima invertase dessas cepas estava plenamente funcional e através da análise da curva de crescimento em presença de sacarose (tempo de geração em torno de 1h), verifica-se que o sistema de transporte do carboidrato também estava operando normalmente.

*Bacillus cereus* são conhecidos como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, portanto, esses resultados sugerem que essas cepas perderam a capacidade de fermentação e aceitam exclusivamente a molécula de oxigênio como aceitador final de elétrons. Foi verificado também a produção de toxinas. As toxinas estudadas foram fosfolipase C, hemolisina e toxina letal para camundongos. Todas as cepas apresentaram atividades para fosfolipase C, hemolisina e toxina letal para



camundongos. A dose letal média (DL50 ) para a toxina letal das cepas variou em torno de  $10^6$  UFC/mL, calculada pelo método de Reed-Muench. Esses resultados corroboram com a assertiva de que a intoxicação alimentar por ***Bacillus cereus*** pode ocorrer apenas quando o alimento contém uma quantidade grande de células viáveis (acima de  $10^6$  UFC/g).

## INTRODUÇÃO

O Paraná é um importante produtor brasileiro de milho. A parte nobre da industrialização do milho é a extração do óleo e tem como sub-produto a parte amilácea do grão que é comercializado como “grid” e como fubá. O fubá consiste numa importante fonte energética, principalmente na alimentação das camadas de menor poder aquisitivo da população. A quantidade de fubá produzida no Paraná é superior às necessidades da demanda de consumo interno, sendo exportado em grandes quantidades para outros estados principalmente para a região nordeste. Nesta região o fubá constitui a base da alimentação das populações mais carentes, consumido na forma de massa obtida após cozimento do fubá, água e sal, denominada popularmente de “angu de fubá”. O angu freqüentemente constitui um prato único e é enriquecido com molho carne cozida. Esta é a base da alimentação de toda a família, das crianças desmamadas até as pessoas de idade, na merenda escolar. Em todo o Brasil, o consumo de fubá é muito grande.

Uma variante utilizada como alimento energético nessas camadas da população é a farinha de mandioca. À semelhança do fubá, é também consumida freqüentemente na forma de angu e tem constituição amilácea semelhante. Tem ainda o agravante de ser consumida com pratos prontos (sopas de peixes, carnes), quando então é consumido sem cozimento.

O conhecimento dessas informações levaram Higuti et al. (1996), num trabalho anterior, a avaliar microbiologicamente a qualidade do fubá e da farinha de mandioca adquiridos no mercado varejista de Curitiba. Verificou-se a presença de bolores e leveduras, bactérias mesófilas, coliformes totais, coliformes fecais, **Escherichia coli**, **Bacillus cereus**, e **Staphylococcus aureus**.

As amostras de **Bacillus cereus** isoladas, foram caracterizadas bioquimicamente e morfológicamente (HIGUTI et al. 1997), segundo a técnica descrita por SNEATH (1986) e SPECK (1984).

Foram realizados estudos sobre o metabolismo do **Bacillus cereus** isolados de fubá e farinha de mandioca haja vista que o **Bacillus cereus** é uma das bactérias mais comumente relatada como responsável por casos ou surtos de toxinfecções de origem alimentar (INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1978).

Tendo como habitat principal o solo, o **Bacillus cereus** é amplamente disseminado no ambiente natural o que contribui para que seja encontrado em diversos tipos de alimentos, predominando em produtos desidratados, amidos e farinhas como demonstrado no trabalho anterior.

Quando se considera a possibilidade de transmissão de doenças pelos alimentos preparados ou não, duas fontes de contaminação devem ser levadas em consideração. A primeira delas é a contaminação do alimento no próprio ambiente natural: contaminação pelo ar, pela irrigação, pela fertilização e pela simples exposição ao ambiente. A segunda possível fonte de contaminação está diretamente relacionada com o homem, pela transferência de organismos parasitas oportunistas ou patogênicos, do portador ou da pessoa infectada ao

alimento durante a lavagem, preparação, acondicionamento de alimentos prontos ou quando este é servido (GUTHRIE, 1994). As doenças produzidas como resultado da contaminação são de dois tipos:

**INFECÇÕES ALIMENTARES**, ocorrem quando há ingestão de células viáveis de microrganismos. No trato digestivo do homem, os microrganismos se multiplicam e por vezes, há a disseminação dos mesmos pelos tecidos.

**INTOXICAÇÕES ALIMENTARES**, ocorrem quando há a ingestão de microrganismos viáveis ou toxinas produzidas pelos microrganismos nos alimentos.

### **CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS DO *Bacillus cereus***

O ***Bacillus cereus*** está incluído na família **Bacillaceae**. Suas células apresentam-se na forma de bastonetes, podendo ou não apresentar flagelos peritríqueos (BERKELEY et al., 1984), geralmente encontrando-se de forma isolada. Suas colônias em meio de cultura específicos são arredondadas, planas, secas, superfície com aparência de vidro moído e bordos irregulares. São bactérias anaeróbicas facultativas e Gram-positivas, com parede celular formada predominantemente por peptidoglicano contendo ácido mesodiaminopimélico (SCHLEIFER & KANDLER, 1972) e por ácido teicóico (RANFTL & KANDLER, 1973). Apresentam um endosporo característico que são esporos muito resistentes às condições adversas. Os endosporos são formados na fase estacionária de crescimento, ou quando as células vegetativas são transferidas de um meio enriquecido para um meio simples (HIGUTI, 1992)

A atividade de água mínima permitindo o crescimento do **Bacillus cereus** é de 0,95, ao passo que a bactéria desenvolve-se em valores de pH oscilando de 4,9 a 9,3. Além disso tolera concentrações de NaCl até 7,5%, mas tem seu crescimento inibido em concentrações de 10% (BANWART, 1979). A bactéria é mesófila, com temperatura ótima na faixa de 30 - 35° C (mínima entre 10 e 20 °C e máxima entre 35 e 45 °C, embora existam referências (GOEPFERT et al., 1972) relatando o crescimento até 49 – 50 °C).

O solo é o seu principal habitat, daí podendo contaminar vários alimentos principalmente vegetais e cereais, podendo também ser encontrados em alimentos industrializados, carnes, etc.

O reconhecimento do **Bacillus cereus** como causador de intoxicação alimentar humana é conhecida a várias décadas, principalmente na Europa onde foram descritos numerosos casos de intoxicação alimentar atribuídos ao **Bacillus cereus** (HAUGE, 1950, 1955; JOINT FAO/WHO, 1968), desde então inúmeros casos vem sendo descritos na literatura.

A intoxicação alimentar causada por **Bacillus cereus** pode manifestar-se sob duas formas clínicas bastante diversas. Uma é a forma clássica que se caracteriza por um quadro clínico descrito como síndrome diarreica e tem um período de incubação de 8-16 h, caracteriza-se por sintomas de cólicas agudas, diarreias intensas e tenesmos retais, as náuseas são moderadas e os vômitos são raros. Nesta forma os sintomas e período de incubação são muito parecidos com a intoxicação alimentar produzida pelo **Clostridium perfringens**.

A segunda forma de manifestação tem um período de incubação curto, na maioria dos casos de 1 a 5 h causando um processo denominado de

síndrome emética, com um quadro clínico de gastroenterite aguda, na qual as náuseas e os vômitos são os sintomas característicos, podendo apresentar também diarreia. Os sintomas são muito parecidos com a intoxicação estafilocócica.

As intoxicações alimentares causadas pelo **Bacillus cereus**, ocorrem quando há a ingestão de alimento contaminado com um número muito elevado de células, geralmente acima de  $10^6$  UFC/g (INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1978), quantidade necessária para que ocorra a produção de enterotoxinas.

Inúmeros autores, realizaram pesquisas sobre a produção de hemolisina, lecitinase ou fosfolipase C e toxina letal para camundongos pelo **Bacillus cereus** e verificaram que as atividades das enzimas e toxinas estão associadas com intoxicações alimentares (BONVENTRE & JOHNSON, 1970; CHRISTIANSSON, 1993; EKLUND, 1985; GRANUM et al., 1993; IVERS & POTTER, 1977; JOHNSON, 1985; KATSARAS, 1977; LAISHLEY, 1975; NOSE et al., 1988; SAAD et al., 1986; SHARMA & DOGRA, 1983; SPECK, 1984; SPIRA & GOEPFERT, 1972; STEC, 1990; SZABO et al., 1991).

O **Bacillus cereus**, na condição de um bacilo esporogênico, é facilmente encontrado em alimentos desidratados que quando novamente reidratados favorecem sua multiplicação e consequente produção de toxinas nestes alimentos.

O controle de **Bacillus cereus** em alimentos é baseado na prevenção do crescimento, uma vez que é quase impossível impedir sua presença em matérias primas.

A refrigeração dos alimentos preparados e prontos para o consumo ou a manutenção em temperaturas acima de 55 °C, impede a proliferação intensa da bactéria, porém alguns ácidos orgânicos como acetato, lactato, formiato, benzóico, p-hidroxi-benzóico apresentam efeito inibitório sobre o **Bacillus cereus** (EKLUND, 1985; HIGUTI, 1992)

## SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Apesar de algumas espécies de **Bacillus** serem patógenos oportunistas, o gênero **Bacillus** com exceção de **Bacillus anthracis**, tem atraído pouco interesse por parte dos microbiologistas. Por isso, estudos sobre a sensibilidade das espécies de **Bacillus** são escassos. De acordo com BERNHARD et al. (1981), **Bacillus cereus** geralmente apresenta alta resistência à ampicilina, colistina e polimixina e sensibilidade à estreptomicina, eritromicina e cloranfenicol.

Embora os antibióticos sejam drogas eficientes, a necessidade de se fazer provas de sensibilidade se tornou uma prática obrigatória pois existem muitas cepas resistentes e outras sensíveis ao mesmo antibiótico da mesma espécie de bactéria.

Quando se fala em resistência bacteriana não se pode deixar de falar nos aspectos genéticos que as comandam:

*Varição genética das bactérias:* As bactérias se dividem por fissão binária de modo que a partir de uma única célula resulta um clone (indivíduos de mesma constituição genética), quando se considera uma população de

células de uma mesma espécie bacteriana admite-se que a mesma não seja geneticamente homogênea.

*A variação genética é determinada por duas causas: mutação, que é uma alteração lenta e espontânea no material genético transmitido aos descendentes, resultando em bactérias que possuem características genéticas que as fazem distintas das demais e recombinação que é a substituição de genes homólogos, provenientes de uma célula doadora, em uma célula receptora.*

Os mecanismos de resistência aos agentes microbianos podem ser explicados por um ou mais mecanismos gerais (impermeabilidade que é a diminuição da concentração da droga na célula, alteração da molécula alvo que previne a ligação da droga à bactéria e inativação enzimática da droga) provenientes das diferenças essenciais entre os microrganismos Gram positivos e Gram negativos. As bactérias Gram positivas possuem parede espessa constituída de mais de 60%, por uma camada rígida de mucopeptídeos. Esta camada é formada externamente, por um emaranhado de moléculas de ácido teicóico impregnada com ribonucleato de magnésio. As Gram negativas, ao contrário, possuem uma delgada camada de mucopolipeptídios, que compreende no máximo 20% da parede celular. Os principais constituintes químicos da parede celular dos Gram negativos são os lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Uma pressão osmótica de aproximadamente 20 atm existe no interior das células Gram positivas, contra apenas 5 atm nas Gram negativas.

Para atuarem, alguns agentes antimicrobianos primeiro aderem à superfície da parede celular (na maioria das vezes as células sensíveis fixam maior quantidade de antibiótico do que as resistentes). O agente antimicrobiano



precisa atingir a estrutura sobre a qual irá atuar e, conseqüentemente deve ser capaz de penetrar através da parede celular. A maioria deles necessita também atravessar a membrana citoplasmática. Existe uma diferença quanto a capacidade de penetração dos antibióticos em relação às bactérias Gram positivas e Gram negativas. Esta diferença está relacionada com a composição química dos respectivos grupos.

Os antibióticos podem ser divididos em quatro grupos, de acordo com o mecanismo de ação relativo às diferentes estruturas da célula bacteriana:

*Antibióticos que agem à nível da síntese da parede celular:* neste grupo estão incluídas as penicilinas e as cefalosporinas (a parte básica é um ácido orgânico com um anel  $\beta$ -lactâmico), que bloqueiam a formação das ligações transversais entre as cadeias lineares de polipeptídios, responsáveis pela rigidez da parede celular. Os inibidores da  $\beta$ -lactamase foram associados a algumas penicilinas, por exemplo a ampicilina, amoxicilina e ticarcilina, para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase.

*Antibióticos que alteram as membranas celulares:* grupo constituído pelas polimixinas, peptídios básicos que agem como detergentes catiônicos para causarem a lise da lipoproteína da membrana celular.

*Antibióticos que inibem a síntese protéica:* compreendem a maioria dos antibióticos de largo espectro, como o cloranfenicol que bloqueia a incorporação de aminoácidos pelas cadeias polipeptídicas das células bacterianas e as tetraciclina que bloqueiam a ligação do RNA transportador com o complexo de aminoácidos e por conseguinte, paralisam a síntese protéica. Os aminoglicosídeos que compreendem a gentamicina, tobramicina, netilmicina, amicacina e estreptomicina inibem a síntese de proteínas

bacterianas através da interferência com o tRNA bacteriano à subunidade 30 S do ribossomo.

*Antibióticos com atividade antimetabólica:* as sulfonamidas são verdadeiros antimetabólitos; elas bloqueiam uma etapa específica na via biossintética do ácido fólico. A associação trimetropim e sulfametoxazol (sulfazotrim) bloqueia etapas sequenciais na via da síntese do ácido fólico.

## OBJETIVOS

Tendo em vista que o **Bacillus cereus** é um microrganismo responsável por inúmeros casos de intoxicações alimentares, pretendeu-se neste trabalho estudar o metabolismo do **Bacillus cereus** isolados do fubá e farinha de mandioca adquiridos no mercado varejista da cidade de Curitiba.

Na primeira etapa deste trabalho avaliou-se a produção, pelo **Bacillus cereus** de hemolisina, fosfolipase C, toxina letal para camundongos e a dose letal que mata 50% dos camundongos (DL 50), nas trinta e uma cepas isoladas de **Bacillus cereus**.

Numa segunda etapa do trabalho pretendeu-se fazer testes de sensibilidade a certos antibióticos (estreptomicina, gentamicina, amicacina, cloranfenicol, polimixina, sulfazotrim, ampicilina, penicilina, eritromicina e sulfonamidas)

Na terceira etapa deste trabalho pretendeu-se fazer um estudo sobre o crescimento do **Bacillus cereus** em presença de sacarose e um estudo sobre

a síntese da enzima invertase e algumas de suas propriedades bioquímicas tais como:

- a) determinação do pH ótimo.
- b) determinação da temperatura ótima.
- c) efeito da concentração da enzima.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MICRORGANISMO

Para a realização dos ensaios foram utilizadas amostras de **Bacillus cereus** isoladas de fubá e farinha de mandioca adquiridos em vários mercados da cidade de Curitiba. Cada cepa foi identificada pelo número da amostra de alimento e caracterizada bioquímica e morfológicamente de acordo com o método de SPECK (1984).

O microrganismo de controle utilizado foi o **Bacillus cereus** ATCC 145798. A cepa original foi cedida gentilmente pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), Curitiba, PR.

### CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

As cepas de **Bacillus cereus** foram repicadas em meio de cultivo sólido composto por um ágar simples inclinado em tubo de ensaio. O ágar simples é composto de 1,5% de ágar bacteriológico, 1% de peptona e 1% de NaCl. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120 °C e depois inclinado. Após as cepas terem sido repicadas para esse meio foram incubadas a 37 °C durante 16 h e armazenadas na geladeira. Repiques para o mesmo meio foram feitos em intervalos regulares de aproximadamente 30 dias.

## MEIO DE CULTIVO

Meio básico: Foi utilizado um meio líquido básico, descrito por GOLLAKOTA & HALVORSON, (1960), que continha os seguintes componentes:  $MgSO_4$  0,8 mM,  $MnSO_4$  0,04 mM, NaCl 0,2 mM,  $CaCl_2$  0,2 mM,  $ZnSO_4$  0,05 mM,  $FeSO_4$  0,06 mM e extrato de carne a 1%. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm de pressão.

Tampão:  $(NH_4)_2SO_4$  3,0 mM,  $KH_2PO_4$  3,5 mM, ajustado o pH para 7,0 e autoclavado em separado para evitar a precipitação de sais do meio de cultivo.

Sacarose: Solução de sacarose a 50% foi esterilizada em vapor fluente, durante 30 min. A concentração final de sacarose no meio de cultivo foi de 2%.

PRÉ-INÓCULO: As células crescidas em meio sólido foram transferidas para um frasco de 125 mL, contendo 50mL de meio básico suplementado com sacarose 2% e incubado em estufa a 36 °C, por 18 horas.

INÓCULO: Tomou-se 10 mL do pré-inóculo e adicionou-se a frascos de 1000 mL contendo 500 mL de meio básico e incubou-se sob agitação mecânica em um "Shaker" a 120 rotações por min a 28 °C.

## TESTE DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O teste de fermentação de carboidratos (manitol, sacarose, lactose e glucose) foi realizado utilizando-se um meio sintético da Difco, contendo indicador vermelho de fenol.

## ATIVIDADES DAS ENZIMAS:

### 1 - HEMOLISINA

Em uma placa de “ágar sangue de carneiro”, contendo ágar nutriente simples (extrato de carne 0,3%, peptona 0,5%, e ágar 1,5%) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado, foi feita a semeadura da cultura de **Bacillus cereus** isolados de alimentos e incubado à 36 °C durante 24 horas. Após este período de incubação, um halo transparente ao redor das colônias indicou reação positiva para a beta-hemolisina.

### 2- FOSFOLIPASE C

Para a detecção da atividade da fosfolipase C, 1 mL de emulsão de gema de ovo à 20% foi adicionada em 10 mL de caldo nutriente simples estéril contendo extrato de carne 0,3%, peptona 0,5% e 1% de NaCl.

Preparação da emulsão de gema de ovo:

- a) mergulhar um ovo inteiro em solução aquosa de cloreto de mercúrio 1:1000 por não menos que 1 min.
- b) enxaguar em água estéril e secar com gaze também estéril.
- c) quebrar a casca do ovo e separar a gema da clara assepticamente.
- d) misturar agitando sempre 20 mL de gema do ovo e completar o volume de 100 mL com solução salina 0,85%.

Adicionar 1 mL da emulsão de gema de ovo a frascos contendo 10 mL de caldo nutriente simples.

Cultura de **Bacillus cereus** isolados foi inoculada neste caldo e incubada a 37 °C, durante 24 horas. A formação de um espesso caldo leitoso indicou reação positiva para a produção de fosfolipase C.

### 3 - PRODUÇÃO DA TOXINA LETAL PARA CAMUNDONGOS E CÁLCULO DA DL50.

As cepas de **Bacillus cereus** isoladas foram repicadas em 30 mL de infusão de cérebro-coração (BHI), suplementado com 1% de glucose e incubado a 28° C durante 17 h, sob agitação mecânica à 120 rpm, em agitador rotatório (HOQUE et al., 1986; IVERS & POTTER, 1977).

A quantidade de células viáveis por mL foi monitorada fazendo-se diluições em soro fisiológico a partir da cultura de **Bacillus cereus** em BHI (diluições:  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ). Foram semeados 1mL das diluições em placas estéreis e adicionados 15 mL de ágar simples fundido a 100 °C e resfriados a 45 °C (técnica do "pour plate") e incubados a 36 °C por 24 h e realizada a contagem de colônias desenvolvidas na placa. O valor encontrado foi expresso em Unidade Formadora de Colônias (UFC) / mL.

a) *Teste da toxina letal para camundongos:* Para o teste da toxina letal para camundongos, 1 mL da cultura bacteriana crescida em meio BHI ( $10^7$  –  $10^9$  UFC/mL) foi injetada na cavidade intraperitoneal de 5 camundongos.

b) *Determinação da DL50:* A dose letal média (DL(50)) foi estimada pelo método de REED & MUENCH (1938). Para o cálculo da DL50 fez-se as

seguintes diluições da cultura de **Bacillus cereus** em BHI, usando soro fisiológico estéril:

- a) cultura não diluída
- b) diluição  $10^{-0,5}$
- c) diluição  $10^{-1,0}$
- d) diluição  $10^{-1,25}$
- e) diluição  $10^{-1,5}$
- f) diluição  $10^{-2,0}$

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

A cultura de **Bacillus cereus** (1mL) foi injetada na cavidade intraperitoneal de 10 camundongos pesando 30g aproximadamente. A morte do camundongo até 12 h após a injeção foi considerada uma reação positiva. Nos camundongos controle foi injetado 1 mL do meio BHI estéril. A quantidade de células viáveis na cultura não diluída era em torno de  $1,4 \times 10^8$  UFC/mL.

## TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

A técnica de disco de difusão em ágar é o método mais comumente usado em laboratórios clínicos para a mensuração da sensibilidade das bactérias aos vários agentes antibióticos:

**Materiais:** Placas de Petri (15 cm de diâmetro) contendo ágar Müeller Hinton.

Tubos de ensaio contendo caldo nutriente simples (2 mL)

“Swab” estéril

Soro fisiológico estéril para diluição.



Fez-se um inóculo com a cepa de **Bacillus cereus** em caldo simples, incubou em estufa durante 17 h. A concentração bacteriana recomendada como inóculo é de  $10^8$  organismos/ml, equivalente à turvação do padrão n° 5 da escala de MacFarland (BIER, 1984). Este padrão foi preparado adicionando-se 0,6ml de  $BaCl_2$  0,048 M a 99,5 ml de  $H_2SO_4$  0,36 N. A turvação da cultura foi comparada com a turvação do padrão (se a turvação da cultura for menor do que a do padrão é necessário um período maior de incubação e se a turvação for maior é necessário fazer diluições com soro fisiológico).

Um "swab" de algodão estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana e antes de retirá-lo eliminou-se o excesso de líquido, comprimindo-o contra a parede interna do tubo.

A superfície do ágar Müller Hinton foi inoculada estriando-se o "swab" em pelo menos três direções, girando a placa em ângulos de aproximadamente 60° após cada estria a fim de distribuir uniformemente o inóculo.

Deixou-se secar aproximadamente 5 min e depois depositou-se discos de antibióticos com o auxílio de uma pinça estéril. A cada disco colocado flambou-se a pinça e esfriou-se em um algodão embebido em álcool, para evitar contaminar os discos de antibióticos. Logo após incubou-se a 36 °C por 18 h. Leu-se o diâmetro das zonas de inibição de crescimento com o auxílio de um halômetro ou régua. Os resultados foram lidos em uma tabela padrão (KONEMAN et al., 1993).

Os discos de antibióticos usados foram:

Antibacteriano	Abreviatura	Conc./Disco
Clorafenicol	CLO	2 µg

Polimixina	POL	300 U
Sulfazotrim	SUT	25 µg
Ampicilina	AMP	10 µg
Penicilina G	PEN	10 U
Eritromicina	ERI	15 µg
Sulfonamidas	SUL	300 µg
Estreptomicina	EST	10 µg
Gentamicina	GEN	10 µg
Amicacina	AMI	30 µg

#### CURVA DE CRESCIMENTO

Para a análise do tempo de geração do **Bacillus cereus** em presença de sacarose 2%, alíquotas de 5,0 mL da cultura de **Bacillus cereus** em meio básico foram coletadas assepticamente, em intervalos de tempo de 1 h, durante 7 h, e a leitura da absorbância foi lida em espectrofotômetro (Micronal B380) a 550 nm.

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e o tempo de geração (T) foram calculados de acordo com as equações:

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log 2 (t_2 - t_1)}$$

$$T = \frac{1}{\mu}$$

onde, "x1" e "x2" representam as absorbâncias da cultura nos tempos "t1" e "t2", respectivamente, na fase exponencial de crescimento (MONOD, 1949).

#### CINÉTICA DA ENZIMA INVERTASE DO **Bacillus cereus**.

Para a verificação da produção da enzima invertase pelo **Bacillus cereus**, o inóculo foi crescido em meio básico durante 7 h a 28 °C sob agitação, e centrifugado a 4.000 x g por 10 min (centrífuga Sorval RC2B). O sobrenadante foi eliminado e a massa celular obtida, lavada duas vezes com água destilada gelada. O material foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 0,03 M, pH 7,0, e as células rompidas em aparelho de ultrassom (Brownwill biosonic III), dando 5 pulsos de 1 min com intervalos de 1 min e centrifugado a 1000 x g para eliminar as células não rompidas.

A concentração protéica foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

A verificação da síntese da invertase foi monitorada através da dosagem de açúcar redutor, pelo método do DNS (MILLER, 1959). O meio de reação (2,5 mL) foi constituído de tampão TRIS-HCl 0,03 M, pH 7,0, sacarose 0,2 M e o extrato livre de células contendo a enzima.

A mistura foi incubada por 20 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de 3, 5-di-nitro-salicilato e submetida a temperatura de ebulição, por 5 min (MILLER, 1959). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotometro (Micronal B380) a 540 nm.

Para a verificação do efeito do pH sobre a atividade da invertase de **Bacillus cereus**, utilizou-se um sistema de reação com diversos pH. Os

tampões utilizados foram tampão acetato 50 mM, pH 4,1 a 5,4, tampão imidazol-HCl 50 mM, pH 6,3 a 6,9 e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 8,1.

O efeito da concentração da enzima sobre a atividade da invertase foi monitorada utilizando-se várias concentrações protéicas (0 a 45 mg), no meio da reação contendo tampão TRIS-HCl 30 mM, pH 7,0 e sacarose a 0,2 M.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da invertase foi determinada submetendo-se o meio de reação a diferentes temperaturas de incubação (20 a 50 °C), durante 20 min, no meio da reação contendo tampão TRIS-HCl 30 mM, pH 7,0 e sacarose a 0,2 M.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Caracterização morfológica e bioquímica das cepas de **Bacillus cereus**:* A caracterização morfológica e bioquímica de **Bacillus cereus** isolados de fubá e farinha de mandioca está ilustrado na tabela I. Todas as cepas apresentaram colônias características em meio seletivo para isolamento do **Bacillus cereus** (ágar MYP- manitol, gema de ovo e polimixina). O **Bacillus cereus** é manitol negativo, possibilitando, pois, a diferenciação da flora de acompanhamento manitol positiva, que se caracteriza por uma viragem do indicador vermelho de fenol. O **Bacillus cereus** é resistente ainda, frente a concentração de polimixina B, utilizada no meio, que inibe a flora usual de acompanhamento, uma vez que este microrganismo sintetiza a lecitinase os produtos de degradação insolúveis da lecitina da gema de ovo se acumulam ao redor das colônias do **Bacillus cereus** formando um precipitado branco.

Tabela I. Caracterização morfológica e bioquímica de *Bacillus cereus* isolados de fubá de milho e farinha de mandioca\*

AMOSTRA	MYP	GRAM	CRISTAIS DE TOXINA	GELATINASE	VP	VM	MO	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	MAN	GLUCOSE	G / ANAE	LAC	SAC	INDOL	H <sub>2</sub> S	UREASE
15	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
21	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
22	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
23	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
25	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
29	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
31	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
32	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
33	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
34	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
36	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
37	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
38	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
39	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
40	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
41	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
42	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
43	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
44	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
45	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
53	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
58	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
59	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
60	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
62	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
71	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
72	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
79	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
81	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
82	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
87	col. car.	bac + esp	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

MYP - Ágar MYP (manitol-gema de ovo-polimixina). col. car. - Colônias características; GRAM - coloração de Gram. bac + esp - bacilos Gram positivos esporulados; CRISTAIS DE TOXINA - ausência de cristais paraesporais (toxinas); GELATINASE - hidrólise da gelatina VP - Teste de Voges-Proskaner; VM - teste de vermelho de metila; MO - Teste de motilidade; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Redução do nitrato; MANITOL - fermentação do manitol; GLUCOSE - fermentação da glicose; G / ANAE. - fermentação da glicose em anaerobiose; LAC - fermentação da lactose; INDOL - produção de indol; H<sub>2</sub>S - produção de H<sub>2</sub>S; UREASE - Síntese de urease; + teste positivo; - teste negativo

\* - Partes destes resultados foram apresentados no EVINCI - 95 por CORTIANO et al. (1995).

Todas as cepas de **Bacillus cereus** sob o microscópio apresentaram-se na forma de bastonetes Gram positivos e esporulados. (Esporo arredondado, localizado na posição central).

Não apresentam cristais de toxinas, que o difere do **Bacillus thuringiensis** que apresenta estes cristais.

As cepas de **Bacillus cereus** isoladas apresentaram resultados positivos para os testes de:

a - Voges Proskauer (VP) que pesquisa a presença de uma substância intermediária da via metabólica, a acetoína (acetil-metil-carbinol).

b - Vermelho de metila (VM) que pesquisa a presença de produtos ácidos proveniente da degradação da glucose do meio de Clark - Lurbs a ácidos orgânicos de cadeia curta.

c - Teste de motilidade realizado em ágar semi-sólido.

d - Redução do nitrato a nitrito através da nitrato redutase.

e - Produção da gelatinase.

f - Utilização da glucose em aerobiose e anaerobiose.

As cepas de **Bacillus cereus** isoladas apresentaram resultados negativos para os testes de:

a- Utilização do manitol.

b- Utilização da lactose.

c- Produção de indol, não sintetizando a enzima triptofanase, que decompõe o triptofano em indol.

d- Síntese da urease.

e- Produção de H<sub>2</sub>S.

Algumas cepas de **Bacillus cereus** isoladas foram capazes de fermentar a sacarose. Outras não.

*Teste de fermentação da sacarose:* A fig. 1 ilustra o teste de fermentação usando sacarose como fonte de carbono. Todas as cepas foram capazes de utilizar a sacarose em presença de O<sub>2</sub>. Porém em anaerobiose induzida pela adição de uma camada óleo mineral estéril (Nujol) na superfície do meio, para dificultar a difusão do O<sub>2</sub>, algumas das cepas foram incapazes de utilizar a sacarose. Essas cepas foram consideradas aeróbias restritas.

*Síntese da hemolisina:* Todas as cepas foram capazes de sintetizar a hemolisina (fig. 2).

*Síntese de fosfolipase C :* Todas as cepas de **Bacillus cereus** isoladas foram capazes de sintetizar a Fosfolipase C (fig. 3).

*Produção de toxina letal para camundongos e determinação da DL(50):* Todas as cepas de **Bacillus cereus** foram capazes de produzir toxina letal para camundongos. Isto pode ser observado pela morte de todos os camundongos injetados intraperitonealmente com a cultura de **Bacillus cereus**. A fig. 4 mostra que o tempo de morte dos camundongos variou de 28 min a 3 h e 50 min. Os camundongos apresentaram fortes contrações abdominais imediatamente após a inoculação. O peso médio dos camundongos utilizados foi de 30 g (Fig. 5).

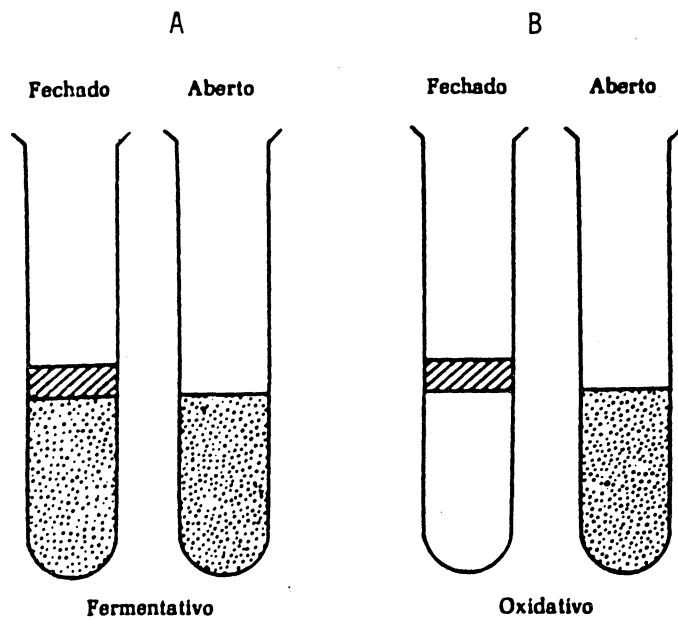


Fig. 1. Ilustração do teste de fermentação versus utilização aeróbica de carboidratos.

A- Teste da utilização anaeróbica de carboidratos.

B- Teste de utilização aeróbica de carboidratos.



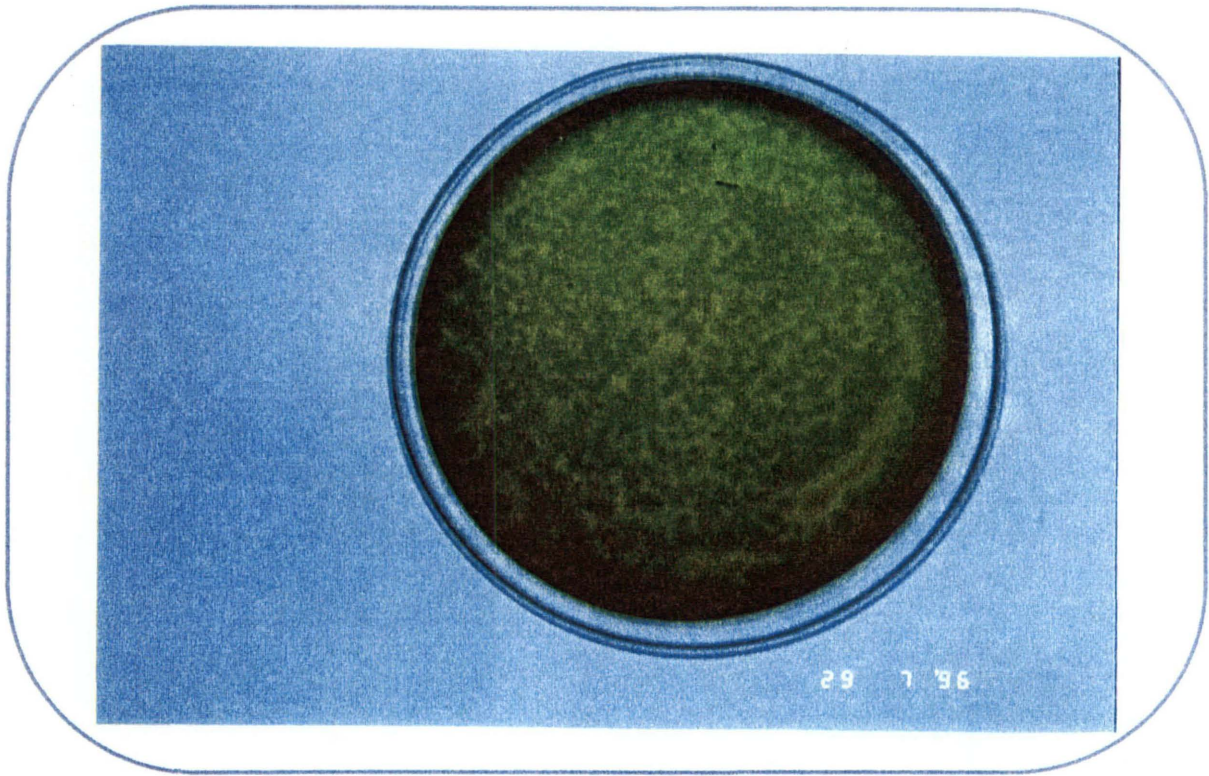


Fig. 2. Atividade da Hemolisina (tipo  $\beta$ - Hemolítico).

Detalhes em materiais e métodos.

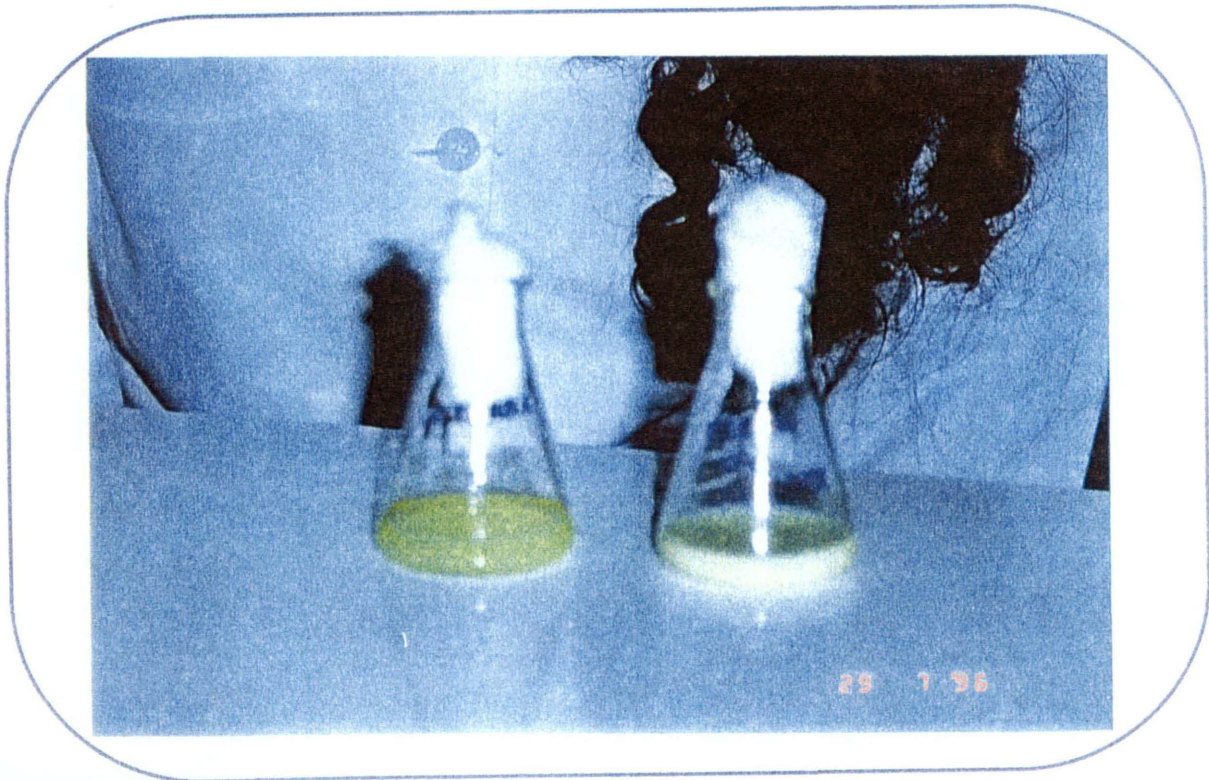


Fig. 3. Atividade da Fosfolipase C ou Lecitinase.

Frasco da esquerda: controle e o da direita: ensaio  
Detalhes em materiais e métodos

## TEMPO DE MORTE DOS CAMUNDONGOS

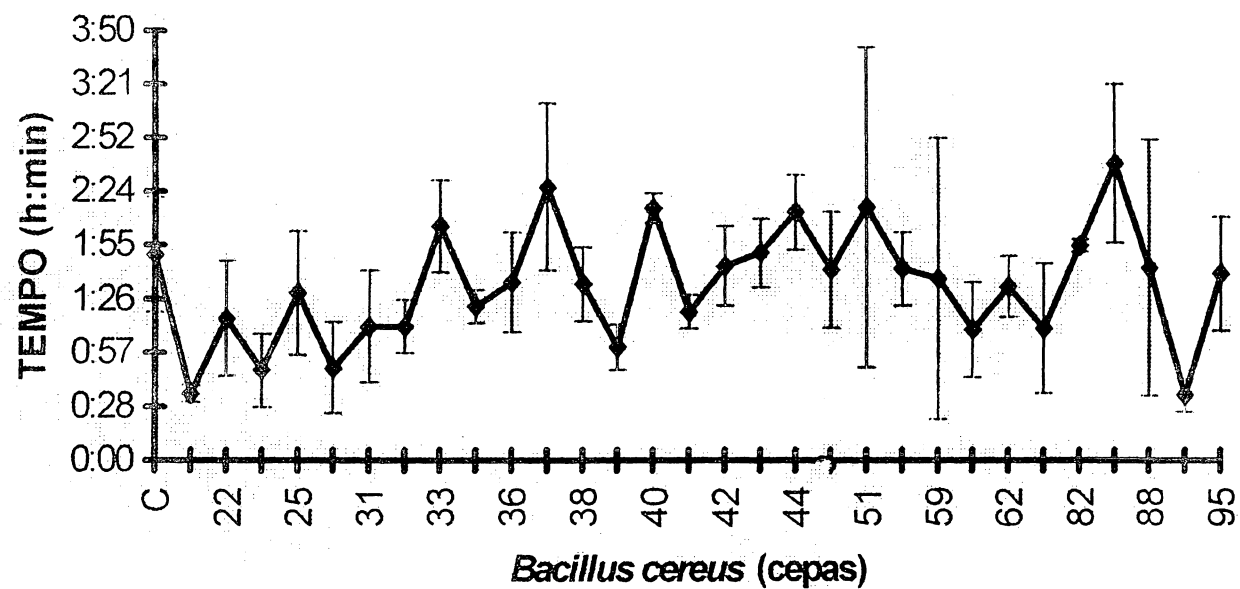


Fig. 4. Tempo de morte dos camundongos.

Tempo de morte dos camundongos tratados com diferentes cepas de *B. cereus*.  
As barras verticais indicam o desvio padrão do tempo de morte.

### PESOS DOS CAMUNDONGOS

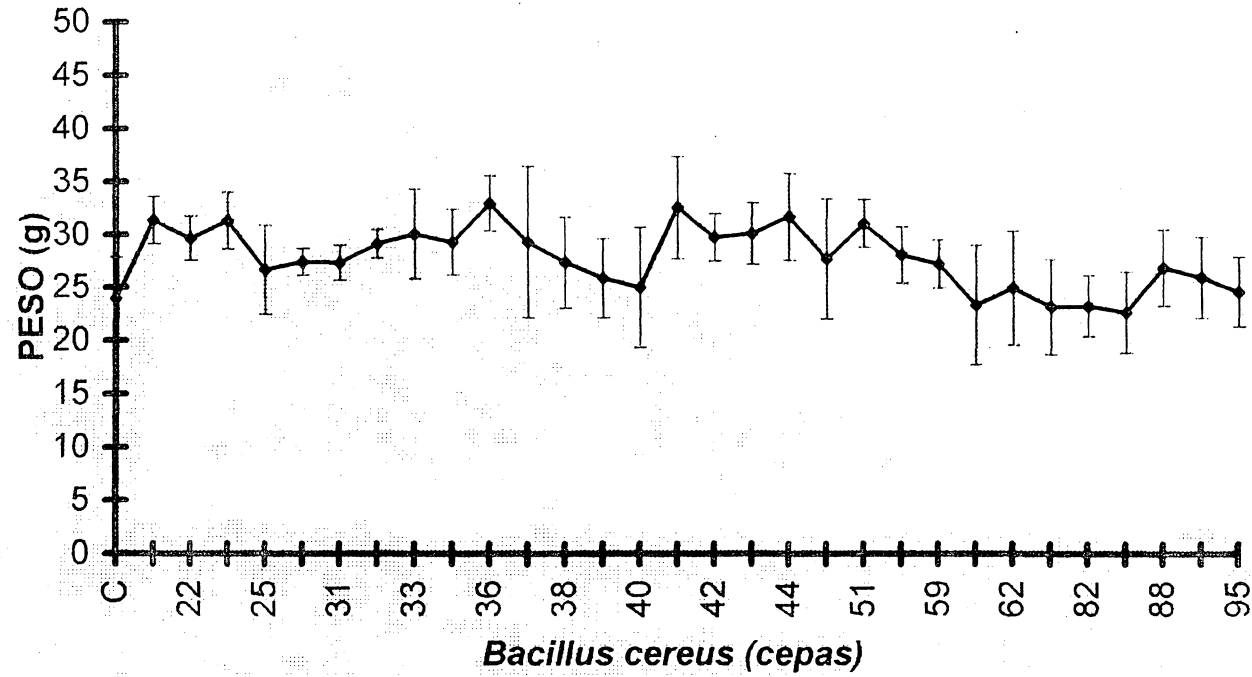


Fig. 5. Peso dos camundongos.  
Peso dos camundongos utilizados, tratados com diferentes cepas de B. cereus.  
As barras verticais indicam o desvio padrão do peso dos camundongos utilizados.

A diluição que provocou a morte de 50% dos camundongos, continha em média  $10^6$  UFC/mL. A fig. 6 ilustra a curva para a determinação da DL(50).

É interessante ressaltar que este ensaio, mesmo bastante utilizado, não caracteriza somente a toxina letal porque é realizado sem nenhuma purificação do extrato bacteriano (IVERS & POTTER, 1977; HOQUE, 1986).

*Teste de sensibilidade a antibióticos:* A tabela II mostra a atividade de alguns antibióticos sobre o **Bacillus cereus**. Verifica-se que as 31 cepas analisadas apresentaram resistência aos antibióticos polimixina e penicilina. Segundo BERNHARD et al. (1978) a resistência a esses antibióticos em **Bacillus cereus** é de herança plasmidial,. Todas as cepas apresentaram sensibilidade à estreptomicina, gentamicina e amicacina. A maioria (27 cepas) apresentou resistência ou atividade intermediária a ampicilina, 18 cepas apresentaram resistência ou atividade intermediária ao sulfazotrim. Todas as cepas apresentaram sensibilidade ou atividade intermediária a eritromicina, 26 cepas apresentaram sensibilidade a sulfonamidas e 24 cepas apresentaram sensibilidade a cloranfenicol.

Segundo OCHI e FREESE (1983), em geral, o tipo de antibiótico e a concentração que afeta o crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos esporos depende das cepas de **Bacillus**.

*Curva de crescimento de Bacillus cereus:* A curva de crescimento (Fig. 7), mostra que o **Bacillus cereus** é capaz de crescer em meio líquido contendo sacarose (2%) como única fonte de carbono. O microrganismo apresentou um

### Curva para determinação da DL50

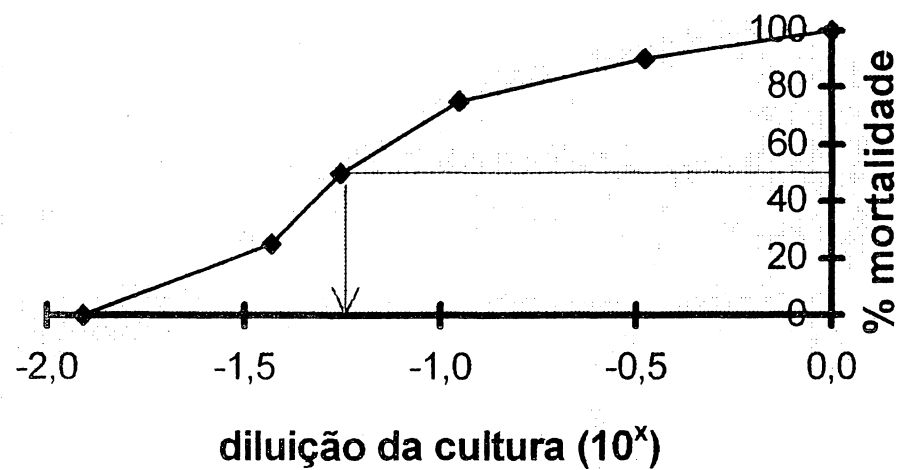


Fig. 6. Curva para a determinação da DL50.

Detalhes em materiais e métodos.

Tabela II. Teste de sensibilidade a antibióticos

Cepa	Antibióticos									
	EST	GEN	AMI	CLO	POL	SUT	AMP	PEN	ERI	SUL
15	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
21	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
22	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S
23	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
25	S	S	S	S	R	I	I	R	S	R
29	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
31	S	S	S	S	R	S	I	R	S	S
32	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
33	S	S	S	S	R	I	R	R	S	R
34	S	S	S	R	R	I	R	R	S	I
36	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S
37	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S
38	S	S	S	I	R	I	R	R	S	S
39	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S
40	S	S	S	S	R	I	R	R	S	I
41	S	S	S	I	R	I	R	R	S	S
42	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
43	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
44	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S
45	S	S	S	S	R	I	I	R	S	S
53	S	S	S	I	R	I	R	R	S	S
58	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
59	S	S	S	R	R	I	R	R	S	S
60	S	S	S	R	R	I	R	R	S	S
62	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S
71	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S
72	S	S	S	S	R	I	R	R	I	S
79	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
81	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
82	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
87	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
ATCC	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S

R - resistente; S - sensível; I - intermediário

EST- estreptomicina; GEN - gentamicina; AMI - amicacina; CLO - cloranfenicol; POL - polimixina B; SUT - sulfazotrim; AMP - ampicilina; PEN - penicilina G; ERI - eritromicina; SUL- sulfonamidas

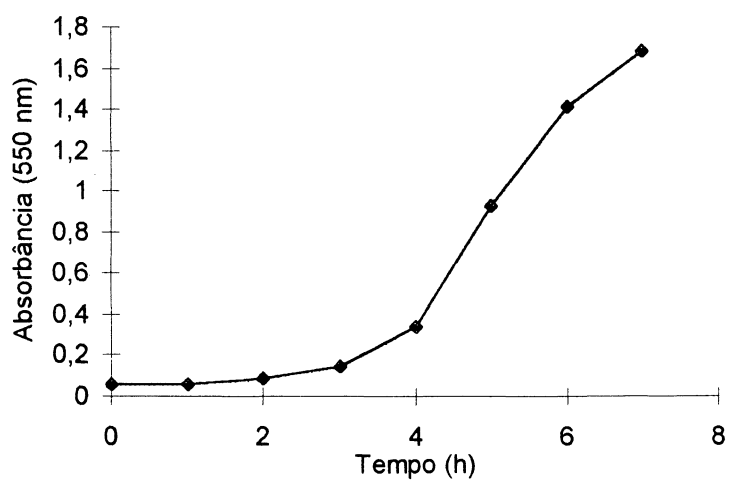


Fig. 7. Curva de crescimento de *B. cereus* usando sacarose como fonte de carbono

Curva de crescimento da cepa de B. cereus ilustrando a utilização da sacarose.

Detalhes em materiais e métodos.

tempo de geração de 52 min. Esses resultados são semelhantes aos obtidos com a cepa ATCC 145798 por HIGUTI (1992).

*Atividade da enzima invertase de **Bacillus cereus***: Como algumas cepas não fermentavam a sacarose foram realizados ensaios para verificar o nível de atividade dessa enzima em todas as cepas.

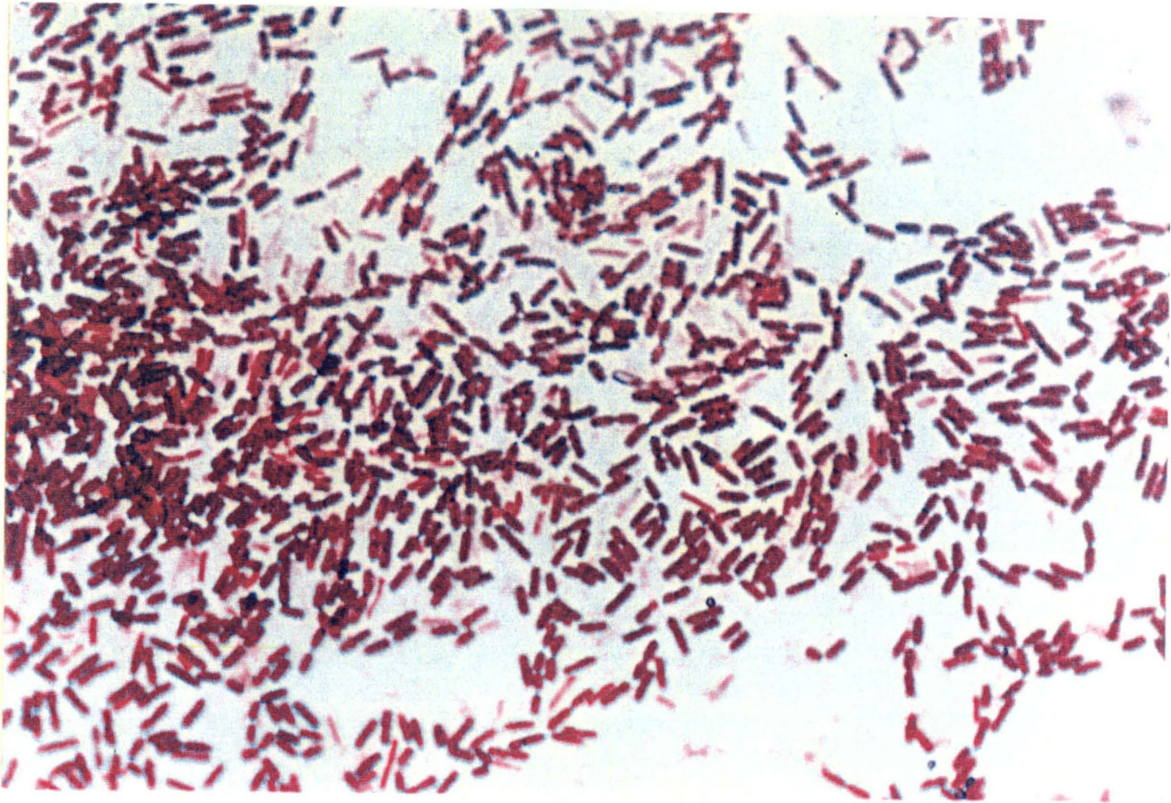
A atividade da invertase, monitorada pelo método do DNS (MILLER, 1959), foi ensaiada no extrato livre de células obtidas pela centrifugação das células rompidas (fig. 8). A enzima apresentou um platô de atividade entre 40 a 45 °C e um pH ótimo em torno de 7,0 (fig. 9 e 10). O uso de temperaturas elevadas em longos períodos de incubação não é recomendado porque produzem altas taxas de evaporação. Assim sendo, a temperatura de 37 °C foi escolhida para os ensaios de rotina. Ao contrário do verificado por LAISHLEY (1975) em **Clostridium pasterianum** o uso de tampão fosfato no meio de incubação para ensaio da invertase de **Bacillus cereus** resulta em baixa atividade da enzima. Melhores resultados foram obtidos com tampão Tris-HCl 0,03M, pH 7,0.

A velocidade da atividade da invertase é diretamente proporcional a concentração protéica (fig.11). Para resolver o problema surgido com a baixa atividade enzimática e a turbidez provocada pelo excesso de proteína, foi escolhida a concentração protéica de 1 a 2 mg por ensaio.

Verificou-se que as cepas de **Bacillus cereus** isoladas de alimentos, possuem atividade da invertase e um sistema de transporte operando normalmente, apesar de algumas delas não apresentarem a capacidade de fermentarem a sacarose (tabela III).



A



B

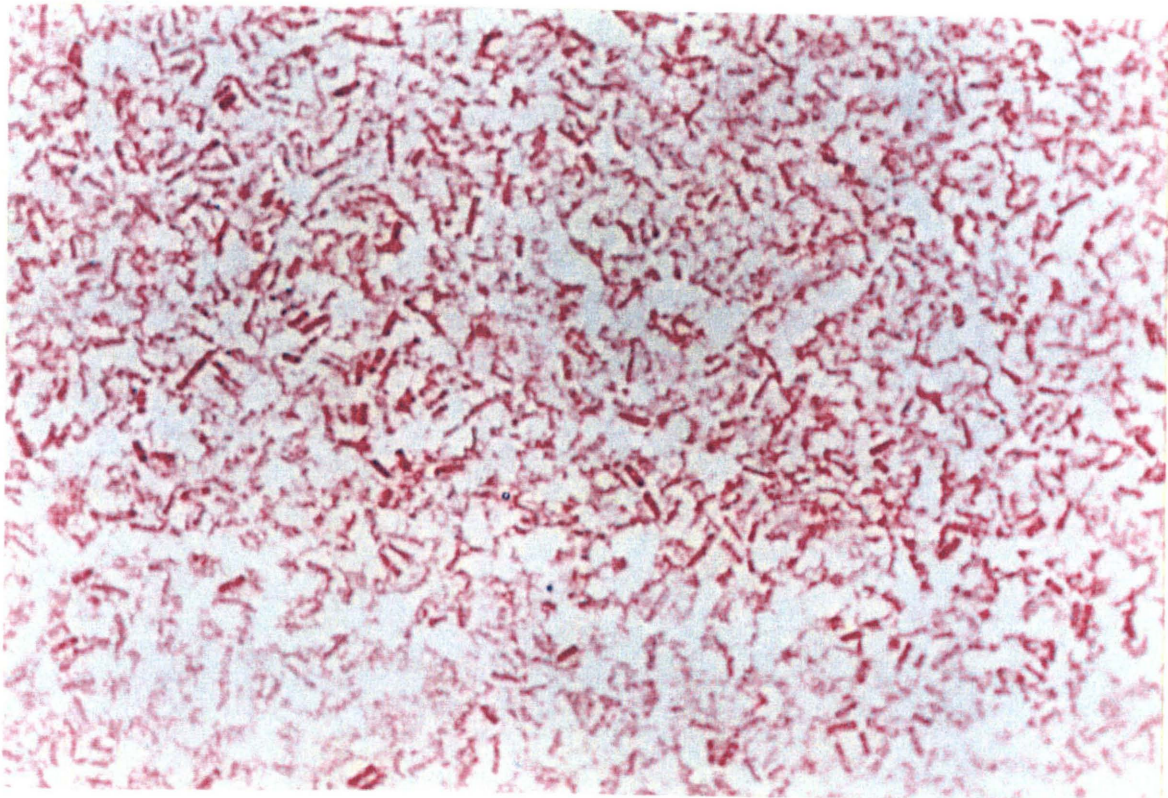


Fig. 8. Fotografia obtida em microscópio ótico de *Bacillus cereus* isolados de alimentos em Curitiba.

A- Células intactas      B- Células rompidas por ultrassonicação.

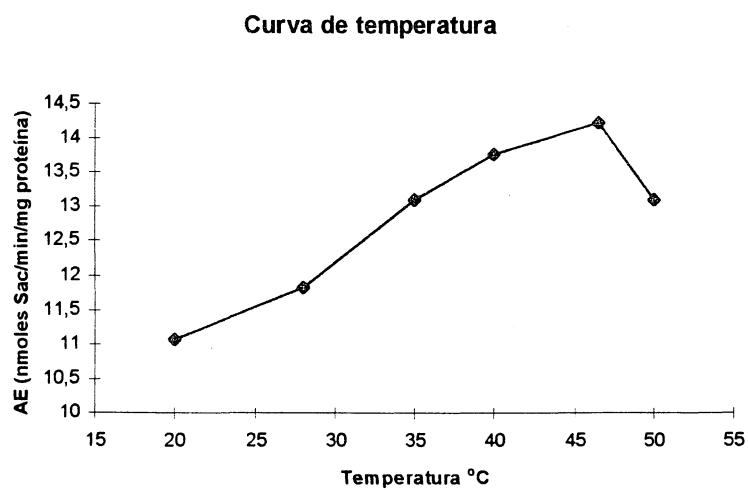


Fig. 9 Curva de temperatura da invertase de *B. cereus*,

A enzima foi ensaiada no extrato bruto.

Detalhes em materiais e métodos.

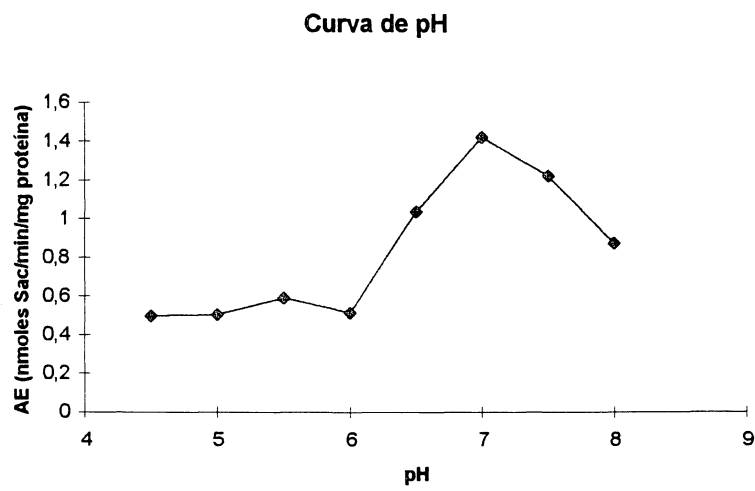


Fig. 10. Curva de pH da invertase de *B. cereus*.

A enzima foi ensaiada no extrato bruto.

Detalhes em materiais e métodos.

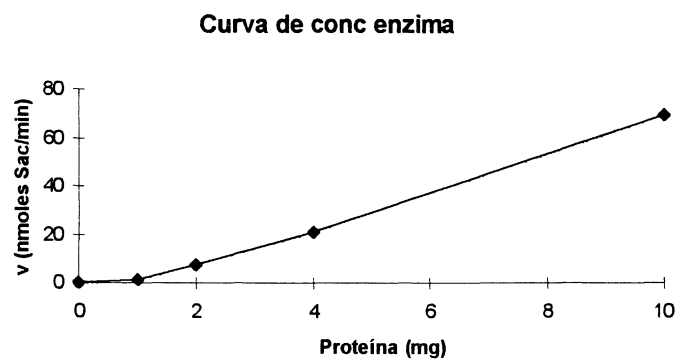


Fig. 11. Curva de concentração protéica para a invertase de *B. cereus*,  
A enzima foi ensaiada no extrato bruto.  
Detalhes em materiais e métodos.

Tabela III. Fermentação da sacarose e atividade da invertase em cepas de *B. cereus*

CEPAS	FERMENTAÇÃO DA SACAROSE	AE INVERTASE (nmoles/min/mg)
29	-	0,5
31	-	0,3
33	-	2,0
36	-	1,9
37	-	2,0
58	-	0,6
79	-	
87	-	0,7
15	+	0,6
21	+	0,6
22	+	0,5
23	+	0,6
25	+	0,5
32	+	1,0
34	+	2,0
38	+	2,0
39	+	2,5
40	+	1,9
41	+	1,7
42	+	1,6
43	+	1,8
44	+	2,1
45	+	0,5
53	+	0,6
59	+	
60	+	0,6
62	+	0,5
71	+	0,7
72	+	
81	+	0,6
82	+	0,8

AE – Atividade específica da invertase em nmoles de sac. hidrolisada/min/mg de proteína.

O **Bacillus cereus** é conhecido como uma bactéria anaeróbia facultativa. Entretanto, observou-se que algumas cepas (8) requerem exclusivamente o oxigênio como aceitador final de elétrons.

## CONCLUSÕES

1. As cepas de **Bacillus cereus** isoladas dos alimentos (fubá e farinha de mandioca) sintetizam a fosfolipase C, hemolisina e toxina letal para camundongos. Estas toxinas são responsáveis pelo quadro de intoxicações alimentares causados pelo **Bacillus cereus**.

2. A quantidade de células de **Bacillus cereus** capaz de provocar a morte de 50% dos camundongo foi de  $10^6$  UFC/ml. Esse dado corrobora com a assertiva de que a intoxicação alimentar por **Bacillus cereus** pode ocorrer apenas quando o alimento contém uma grande quantidade de células viáveis, mostrando a baixa toxicidade deste microrganismo.

3. **Bacillus cereus** isolados são resistentes a polimixina e penicilina. São sensíveis à gentamicina, estreptomicina e amicacina. Apresentam resistência e/ou sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol, sulfazotrim, ampicilina e sulfonamidas.

4. Apesar do **Bacillus cereus** ser considerado uma bactéria anaeróbica facultativa, das 31 cepas isoladas, 8 cepas apresentaram-se totalmente dependentes de oxigênio como aceitador final de elétrons na respiração celular, portanto aeróbicas restritas. Estes resultados sugerem um modelo experimental interessante para o ensaio do metabolismo oxidativo. Foram observadas cepas da mesma bactéria que fazem a fermentação ou que requerem exclusivamente o oxigênio como aceitador final de elétrons.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANWART, G.J. *Basic Food Microbiology*. Conn. USA:AVI Publ. Company Westport, 1979.

BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A. ; SHUTE, L.A.; CAPEY, A.G.  
*Identification of Bacillus species*. In: BERGAN, N. (ed) *Methods of Microbiology* 16. London: Academic Press, 1984. p. 291-328.

BERNHARD K; SCHREMPF H; GOEBEL W. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 133, p. 897-903, 1978.

BIER, O. *Microbiologia e imunologia* 23<sup>a</sup> Ed. São Paulo:Melhoramentos, 1984 p. 930-932.

BONVENTRE, P.F. ; JOHSON, C.E. Microbial Toxins. In: *Bacillus cereus toxin*, (ed.) MONTIE, T.C.; KADIS, S. ; AJL, S.J. New York: Academic Press , 1970, p. 415-434.

CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 47(2), p. 79-87, 1993.

EKLUND, T. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propiopic acid and esteres of p-hydroxy benzoic acid. *Int. J. Food Microbiol.* v. 2, p. 159-167, 1985.



- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W. M.; KIM, H.V. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. *Rev. J. Milk Food. Technol.*, Mysore, v. 35, p. 213-227, 1972.
- GOLLAKOTA, K.G. & HALVORSON, H.O. Biochemical changes occurring during sporulation of *Bacillus cereus*. Inhibition of sporulation by alpha-picolinic acid. *J. Bacteriol.*, v. 79, p. 1-8, 1960.
- GUTHRIE, R.K. *Food sanitation*, Westport. Qui, 1994.
- HAUGE, S. *B. cereus* as a cause of food poisoning. *Nord. Hyg. Tidskr.* v. 31, p. 189, 1950.
- HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 18, p. 591-595, 1955
- HIGUTI, I. H.; Estudos sobre o metabolismo oxidativo e caracterização da F1-ATPase de *Bacillus cereus*, *Tese de Doutorado*, UFPR, Curitiba, Pr., 1992.
- HIGUTI, I.H.; HUSAK, W.S.; CORTIANO, L.; BRANCO FILHO, M.O.; BLASKOWISKI, M.M.M.; NASCIMENTO, A.J. Microbiological survey on corn and cassava flour obtained at local market in Curitiba. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 16, p. 32-35, 1996.
- HIGUTI, IH, MACENA, IR, CORTIANO, L, BRANCO FILHO, MO, BLASKOWISKI, MMM, NASCIMENTO, AJ. Characterization of *Bacillus cereus* contaminant in corn and cassava flour samples in Curitiba. *Revista de Microbiologia*, v. 28 p. 47-49, 1997.

HOQUE, M.M.; CHOWDHURY, A.A.; JOADER, G.K. Study on the production of toxins by *Bacillus cereus* isolated from different foods and food material in Bangladesh. *Bangladesh J. Bot.*, v. 15(1), p. 21-25, 1986.

INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS., *Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration*, Toronto: University of Toronto Press, 2nd Ed., 1978, p. 434.

IVERS, J.T.; POTTER, N.N. Production on stability of haemolysin, phospholipase C and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. *J. Food Prot.*, v. 40(1), p. 17-22, 1977.

JOHNSON, K.M. *Bacillus cereus* foodborne illness; an update. *J. Food Prot.*, v. 47(2), p. 145-153, 1985.

JOINT FAO/WHO *Expert Committee on Microbiological Aspects of Food Hygiene*. World Health Organization, Technical Report Series, n° 399, 1968

KATSARAS, K.; ZELLER, V.P. Detection of *Bacillus cereus* toxins. *Zentralb. Baktiol. Parasitkde*, v. 238, p. 255-267, 1977.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, Jr. V.R.; SOMMERS, H.M. *Diagnóstico microbiológico* 2 ed. São Paulo: Editora Médica Panamericana, 1993

LAISHLEY, E.J. Regulation and proprieties of an invertase from *Clostridium pasterianum*. *Can. J. Microbiol.*, v.21, p.1711-1718, 1975.

- LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; LEWIS FARR, A.L.; RANDALL, R.J.  
Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193,  
p. 265-275, 1951.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing  
sugar. *Anal. Chem.*, v.31 (3), p. 426-428, 1959.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annu. Ver. Microbio.* v. 3, p. 371-  
394, 1949.
- NOSE, M.; HIRATA, I.; ARAI, T.; OHTA, K.; SAKAI, S. Antibacterial action  
of sodium citrate in combination with sodium cholate on Gram negative  
food poisoning and food spoilage bacteria. *Journal of the Food Hygienic  
Society of Japan*, v. 29(1), p. 38-46, 1988.
- OCHI, K.; FREESE, E. Effect of antibiotics on sporulation caused by the  
stringent response in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol. Reading*, v. 129,  
p.3709-3720, 1983
- RANFTL, H.; KANDLER, O. D- aspartil-L-alaninals interpeptidbrücke im  
Murein von *Bacillus pasteurii* Mizula. *Z. Naturforsch., Tübingen*, v. 28, p. 4-  
8, 1973.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent  
endpoints. *Am. J. Hygiene*, v. 27 p. 493-497, 1938
- SAAD, N.M.; EL-BASSIONY, T.A.; AHMED, A.A.H.; MOUSTAFA, M.K.  
Effect of potassium sorbate on the growth of *Bacillus cereus* in milk and  
ice-cream. *Assiut Veterinary Medical Journal*, v. 18(35), p. 162-165, 1986.

- SCHLEIFER, K. H.; KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, Washington, v. 36, p. 407-477, 1972.
- SHARMA, P.L.; DOGRA, R.C. *Bacillus cereus* enterotoxins and its production in different foods. *J. Food Sci. Technol.*, v. 20(3), p. 223-227, 1983.
- SKECK, M. L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Washington: American Public Health Association, 1994.
- SNEATH, P.H.A. Endospore-forming gram positive rods and cocci In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S. ; SHARPE, M. E. & HOLT, J. H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. London: William & Wilkins, 1986 p. 1104-1207.
- SPECK, M.L *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Washington: American Public Health Association, 1984.
- SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* induced ileal loops. *Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 341-348, 1972.
- STEC, E. Intensity of haemolysin and lecithinase production by *Bacillus cereus* strains isolated from food,. *Raczniki Panstwowej Zakladu Higieny*, v. 41(3/4), p. 194-199, 1990.
- SZABO, R.A.; SPEVIS, J.I.; AKHTAR, M. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *Journal of Food Protection*, v. 54(4), p. 272-276, 1991.